

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.04.013

rAAV-shRNA-CDK2 对肝癌人肝癌裸鼠血液系统的影响 *

杨 丹 张 梅 姜 颖 葛圆圆 韩松洋 于英君[△]

(黑龙江中医药大学基础医学院 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要 目的:探讨新型基因药物 rAAV-shRNA-CDK2 对人肝癌裸鼠血液系统的影响,评估其安全性。**方法:**采用皮下接种人肝癌 HepG2 细胞构建荷瘤裸鼠,10 天后将其随机分为 3 组:肿瘤组、NC 组及 rAAV-shRNA-CDK2 组,每组雌雄裸鼠各 6 只。通过尾静脉注射定量给药,15 天后取眼球血并处死裸鼠。检测血常规指标和骨髓细胞周期。**结果:**所有裸鼠平均血小板体积略高于该周龄鼠的正常值范围,但各组间比较差异无统计学意义($P>0.05$);肿瘤组雌性裸鼠的中性粒细胞百分比显著高于 rAAV-shRNA-CDK2 组,而淋巴细胞百分比明显低于 rAAV-shRNA-CDK2 组 ($P<0.05$),但指标数值均在正常值范围内。各组雄性裸鼠骨髓细胞周期分布比较差异均无统计学意义($P>0.05$),而肿瘤组雌性裸鼠骨髓细胞 G2/M 期比例明显高于 rAAV-shRNA-CDK2 ($P<0.05$),但两组其他周期骨髓细胞比例比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论:** rAAV-shRNA-CDK2 并未对人肝癌裸鼠血液系统产生不良影响。

关键词: 肝癌 HepG2 细胞; rAAV-shRNA-CDK2; 基因治疗; 血液系统; 安全性

中图分类号: R-33; R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)04-662-05

Effects of rAAV-shRNA-CDK2 on the Blood System of Nude Mouse Model of Human Liver Cancer *

YANG Dan, ZHANG Mei, JIANG Ying, GE Yuan-yuan, HAN Song-yang, YU Ying-jun[△]

(Basic Medical, Heilongjiang University Of Traditional Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of novel gene drugs rAAV-shRNA-CDK2 on the blood system of nude mice with hepatocellular carcinoma (HCC) and evaluate its safety. **Methods:** To construct tumor bearing nude mice, human hepatoma HepG2 cells were subcutaneously vaccinated into nude mice, they were randomly divided into 3 groups after 10 days: tumor group, NC group and rAAV-shRNA-CDK2 group. 6 males and females in each group were quantitatively administered by tail vein. 15 days later, the eyeball blood was taken and nude mice were killed. The blood routine index and bone marrow cell cycle were detected. **Results:** The mean platelet volume of all mice was slightly higher than the normal range of values of mice with the same age, but there was no significant difference between the groups ($P>0.05$). The percentage of neutrophils in the female nude mice of tumor group was significantly higher than that in the rAAV-shRNA-CDK2 group, while the percentage of lymphocytes was significantly lower than that in the rAAV-shRNA-CDK2 group ($P<0.05$), but the index values were in the normal range. The bone marrow cell cycle distribution of male nude mice in each group showed no significant difference ($P>0.05$); bone marrow cells in G2/M phase of female nude mice in the tumor group was significantly higher than that of the rAAV-shRNA-CDK2 group ($P<0.05$), but there was no significant difference in other two cycles of bone marrow cells proportion between two groups ($P>0.05$)($P>0.05$). **Conclusion:** rAAV-shRNA-CDK2 had no significantly detrimental effect on the blood system of nude mice with human liver cancer.

Key words: Hepatocellular carcinoma HepG2 cells; rAAV-shRNA-CDK2; Gene therapy; Blood system; Safety

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2018)04-662-05

前言

恶性肿瘤是由于体内细胞周期调控机制被破坏,细胞不断进行分裂,不受控制所形成^[1]。研究表明通过调节细胞周期素

(Cyclin)、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)及细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(CKI)可控制细胞周期的进展速度^[2,3]。其中,以 CDK2 为代表的细胞周期蛋白依赖性激酶是细胞周期过程关键的限速因子,其活性增高,可以促进细胞的增殖和分化。抑制

* 基金项目:教育部春晖计划项目(Z2006-1-15014);国家自然科学基金面上项目(81573935)中国博士后科学基金项目(2016M591566);

黑龙江省政府博士后基金项目(LBH-Z15211);黑龙江省自然科学基金项目(H2016074);黑龙江省中医药管理局项目(ZHY16-088)

作者简介:杨丹(1992-),女,学士,硕士研究生,主要从事中药抗肿瘤及肿瘤基因治疗的研究,

电话:15776941272, E-mail: 15776941272@163.com

[△] 通讯作者:于英君(1953-),男,硕士,教授,博士研究生导师,主要从事中药抗肿瘤及肿瘤基因治疗的研究,

电话:13936246132, E-mail: yuyingjun53@aliyun.com

(收稿日期:2017-09-06 接受日期:2017-10-16)

CDK2 或与其相关的 CDK2/CyclinE 复合物的活性,能够阻止细胞周期进程,从而抑制肿瘤细胞的发展^[4-7]。我们前期构建了靶向沉默 CDK2 基因的重组腺相关病毒 rAAV-shRNA-CDK2,在肝癌的模型中已经取得较好的抑瘤效果,体内实验抑瘤率高达 72.18%^[8]。本研究对该基因药物的靶向性和药物毒性进行了初步的安全性评价,旨在为以后的临床试验提供数值依据,为研发出更加安全、可靠的 RNAi 药物提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 BALB/c-nu 裸鼠,购自北京大学医学部实验动物科学部,动物质量合格证号为 SCXK(京)2011-0012。5-6 周龄,雌性,体重 14-16 g;雄鼠,体重 18-20 g;实验裸鼠饲养在无特定病原(specific pathogen free,SPF)动物实验室,恒温(20~26℃),最大日温差≤4,相对湿度(40~70%),空气洁净度 7 级,噪声≤60 dB(A),昼夜明暗交替时间为 12/12 h,所用鼠笼、垫料、饮水均消毒灭菌处理。

1.1.2 瘤株细胞 人肝癌 HepG2 细胞,购自北京协和细胞资源中心。

1.1.3 实验药物 携带有 EGFP 的 rAAV-shRNA-CDK2 由黑龙江中医药大学生物化学与分子生物学实验室设计制备。碘化丙啶(PI)来自 BD 公司。

1.2 实验仪器

Sysmex XT-1800i 全自动血液分析仪;BD FACSVerser 流式细胞仪。

1.3 实验方法

1.3.1 裸鼠移植瘤模型的建立 裸鼠饲养 3 天后开始接种,将处于对数生长期的 HepG2 细胞经过 0.25%的胰蛋白酶消化处理,制成单细胞悬液,计数活细胞数>95%以上,用 PBS 缓冲液稀释细胞悬液浓度至 2×10^7 个/mL,75%酒精消毒裸鼠前肢腋下,取 0.2 mL/只细胞悬液接种于皮下。

1.3.2 分组与给药 10 天后随机分为 3 组:肿瘤组、NC 组以及 rAAV-shRNA-CDK2 组,每组雌雄各 6 只,各组均采用尾静脉注射方法一次性给药,药物及剂量如下:肿瘤组:PBS 缓冲液,0.2 mL/只;rAAV-NC:滴度: 1×10^{12} v·g/mL,0.2 mL/只;

rAAV-shRNA-CDK2:滴度为 1×10^{12} v·g/mL,0.2 mL/只。

1.3.3 样品采集 给药 15 天后,外周血采集:摘裸鼠眼球取血后处死,将血液滴入装有 EDTA 抗凝管内,颠倒混匀,备用。骨髓细胞采集:无菌条件下,完整剥离小鼠股骨,剔除肌肉及结缔组织;剪断股骨两端,用 1 mL 注射器抽取 RPMI1640 溶液反复冲洗骨髓腔,将骨髓冲至抗凝管中;将骨髓细胞经 200 目的尼龙过滤,制备单细胞悬液;RPMI1640 漂洗,4℃,1500 rpm,离心 5 min,弃上清,重复 3 次。应用 RPMI1640 重悬骨髓细胞,细胞计数调整浓度为 1×10^7 /mL;保持活细胞数在 98%以上备用。

1.3.4 处理方法 (1)血液指标检测:将前面准备好的血样,利用 Sysmex XT-1800i 全自动血液分析仪进行检测。测定指标:①红系:红细胞数、血红蛋白浓度、红细胞压积、平均红细胞压积、平均血红蛋白含量、平均血红蛋白浓度、血小板数、红细胞体积分布宽度、红细胞体积分布宽度、血小板体积分布宽度、平均血小板体积、血小板压积;②白系:中性粒细胞比率、淋巴细胞比率、单核细胞比率、嗜酸性粒细胞比率、嗜碱性粒细胞比率。(2)骨髓周期检测:将备好的骨髓悬浮细胞,1500 rpm 离心 5 min,弃上清,收集细胞并计数;用预冷 1 mL PBS 洗细胞 2 次,弃上清;每管加入预冷 75%乙醇,于 -20℃固定 6 h;将固定的细胞,1500 rpm,离心 5 min,弃上清;以 1 mL 预冷的 PBS 漂洗细胞 1 次,弃上清;每管中加入 500 μ L PI;再加入 100 μ g/ml RNase A,37℃水浴箱温浴 30 min;在使用 BD FACS Verse 进行检测后,在 BD 公司 MODFIT 软件上进行分析。

1.4 统计学分析

应用 SPSS17.0 统计分析软件进行统计分析,实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析(One-Way,ANOVA)进行组间差异的比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血液常规数值的比较

采用血液分析仪对三组雌雄裸鼠分别进行血液常规检测,结果见表 1。除平均血小板体积略高于该周龄正常值范围^[9-11],其余指标数值均在正常值范围之内,组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),提示 rAAV-shRNA-CDK2 并未对裸鼠血液常规数值产生不良影响。

表 1 各组血液常规数值的比较

Table 1 Comparison of the blood routine values among different groups

index	N	tumor group(♂/♀)	NC group(♂/♀)	rAAV-shRNA-CDK2 group(♂/♀)
Leukocytes (WBC)($\times 10^9$ /L)	6	3.94± 1.47	4.91± 1.10	4.21± 2.65
Erythrocytes (RBC)($\times 10^{12}$ /L)	6	3.54± 0.50	4.32± 0.81	4.04± 0.47
Hemoglobin (HGB)(g/L)	6	10.07± 1.30	11.26± 1.77	10.25± 0.89
Hematocrit (HCT)(%)	6	10.93± 0.83	11.07± 1.57	11.24± 0.73
	6	150.25± 20.40	167.25± 28.27	153.67± 15.01
	6	160.33± 8.02	163.67± 8.50	159.50± 9.19
	6	45.83± 7.15	51.33± 6.98	47.17± 4.10
	6	48.40± 2.55	47.90± 2.79	49.80± 0.28

表 1 各组血液常规数值的比较(续表 1)

Table 1 Comparison of the blood routine values among different groups

index	N	tumor group(♂/♀)	NC group(♂/♀)	rAAV-shRNA-CDK2 group(♂/♀)
Mean corpuscular volume (MCV)(fL)	6	45.43± 1.22	45.73± 1.60	47.30± 2.54
Mean corpuscular Hemoglobin (MCH)(pg)	6	44.28± 5.29	43.59± 3.42	44.31± 2.34
Mean corpuscular concentration (MCHC)(g/L)	6	14.93± 0.13	14.85± 0.17	14.95± 0.17
Platelet count (PLT)(× 10 ⁹ /L)	6	14.69± 0.42	14.94± 1.80	14.20± 0.10
Red blood cell volume distribution width (RDW-SD) (fL)	6	328.75± 6.55	325.00± 14.47	316.25± 18.39
Red blood cell volume distribution width (RDW-CV)(%)	6	371.01± 40.31	342.07± 18.20	355.97± 18.27
Platelet volume distribution width (PDW)(fL)	6	680.00± 242.93	789.50± 105.47	677.33± 73.24
Platelet volume distribution width (PDW)(fL)	6	555.67± 126.48	583.67± 53.68	569.50± 78.49
Mean platelet volume (MPV)(fL)	6	37.23± 3.00	40.75± 1.50	35.53± 4.49
Plateletcrit (PCT)(%)	6	34.53± 2.45	37.23± 4.14	33.60± 2.12
Plateletcrit (PCT)(%)	6	26.90± 1.92	29.45± 2.79	24.90± 4.33
Plateletcrit (PCT)(%)	6	24.87± 1.96	26.67± 2.67	24.05± 1.63
Plateletcrit (PCT)(%)	6	8.78± 0.44	9.20± 0.57	9.13± 0.52
Plateletcrit (PCT)(%)	6	7.97± 0.32	8.04± 0.50	8.40± 0.28
Plateletcrit (PCT)(%)	6	7.45± 0.10	7.55± 0.26	7.65± 0.19
Plateletcrit (PCT)(%)	6	7.20± 0.60	7.47± 0.37	7.55± 0.35
Plateletcrit (PCT)(%)	6	0.51± 0.18	0.57± 0.08	0.56± 0.40
Plateletcrit (PCT)(%)	6	0.40± 0.07	0.44± 0.06	0.43± 0.08

2.2 各组白细胞系百分比率的比较

如表 2 所示, 雄鼠白细胞系各细胞比率均在正常值范围内,且组间比较差异无统计学意义(P>0.05);肿瘤组雌性中性粒细胞百分比和淋巴细胞百分比和 rAAV-shRNA-CDK2 组比

较差异具有统计学意义(P<0.05),但是各组数值均在正常值范围内^[9,10],提示 rAAV-shRNA-CDK2 对裸鼠的血液系统白细胞系并未产生不良影响。

表 2 各组白细胞比率的比较

Table 2 Comparison of the Leukocyte differential percentage among three groups

Index	N	Tumor group (♂/♀)	NC group (♂/♀)	rAAV-shRNA-CDK2 group(♂/♀)
Neutrophils(NE)(%)	6	10.00± 4.99	9.15± 4.56	6.57± 1.74
Neutrophils(NE)(%)	6	10.71± 0.43	9.12± 0.14	6.91± 0.25*
Lymphocytes(LY)(%)	6	82.75± 3.40	81.80± 2.77	83.10± 6.33
Lymphocytes(LY)(%)	6	81.49± 0.42	82.67± 1.00	83.97± 0.98*
Monocytes(MO)(%)	6	1.38± 1.56	2.55± 1.54	1.43± 1.2
Monocytes(MO)(%)	6	1.48± 1.31	1.85± 0.56	2.09± 0.28
Eosinophils (EO)(%)	6	0.15± 0.19	0.10± 0.08	0.15± 0.24
Eosinophils (EO)(%)	6	0.20± 0.18	0.31± 0.55	0.13± 0.19
Basophils(BA)(%)	6	5.73± 1.23	6.40± 1.41	6.17± 1.52
Basophils(BA)(%)	6	6.11± 1.12	6.03± 0.57	6.88± 1.32

注:* 与肿瘤组比较, P<0.05。

Note: *compare with the tumor group, P<0.05.

2.3 各组裸鼠骨髓细胞周期的比较

如表 3 所示, 各组雄裸鼠 G0/G1、S、G2/M 期细胞比例比较差异均无统计学意义(P>0.05)。如表 4 所示, 肿瘤组雌鼠 G2/M

期比例显著高于 rAAV-shRNA-CDK2 组(P<0.05),但两组其他周期细胞比例比较差异无统计学意义 (P>0.05), 提示 rAAV-shRNA-CDK2 并未对骨髓细胞周期产生影响。

表 3 各组雄裸鼠骨髓细胞周期分布的比较

Table 3 Comparison of the cell cycle of marrow cell of male nude mice among three groups

Indexes	N	G0/G1	G2/M	S
Tumor group	6	81.62 ± 6.72	1.25 ± 0.37	17.13 ± 6.43
NC group	6	80.99 ± 1.6	2.39 ± 0.82	16.63 ± 1.41
rAAV-shRNA-CDK2 group	6	80.85 ± 3.35	1.70 ± 1.24	17.45 ± 2.48

表 4 各组雌裸鼠骨髓细胞周期分布的比较

Table 4 Comparison of the cell cycle of marrow cell of female nude mice among three groups

Indexes	N	G0/G1	G2/M	S
Tumor group	6	78.30± 2.75	3.95 ± 1.61	17.75 ± 1.14
NC group	6	75.67 ± 8.92	3.71 ± 1.09	20.62 ± 7.84
rAAV-shRNA-CDK2 group	6	84.40 ± 3.24	1.55 ± 0.57*	14.06 ± 2.68

注:* 与肿瘤组比较, $P<0.05$ 。

Note:*compare with the tumor group, $P<0.05$.

3 讨论

基因治疗是现代医学的一种新型的治疗方式,其所能治疗的疾病种类已经从单基因遗传性疾病扩大到恶性肿瘤、感染性疾病、心血管疾病、自身免疫性疾病、代谢性疾病等重大疾病的治疗^[12]。本实验室用 RNAi 的技术,结合调控细胞周期限速因子 CDK2, 研制出了新型重组基因靶向药物 rAAV-shRNA-CDK2,借助 AAV8 具有的强烈嗜肝性^[13],靶向作用于肝脏,以达到治疗肝癌的目的。其中,作为载体的 AAV 已被应用于 100 多个临床试验中,并取得了可喜的成果,特别是在治疗 β -地中海贫血和血友病等血液系统疾病当中^[14-16]。随着 AAV 衍生载体在人类基因治疗中的成功率越来越高,对 AAV 持续性的体内位点及其激活的临床后果的定义日益迫切。血清流行病学调查表明 AAV 感染人体是无处不在的,但临床后果在很大程度上是未知的^[17]。虽然有报道称 AAV 载体在血液中的清除率约为 2 小时和 4 小时左右^[18],从一定程度上表明了 AAV 载体对血液产生的影响较小。但又有文献报道显示研究者将超大剂量的载体注入血液中^[19,20],存在着内源性 AAV 与输注的载体 AAV 相结合形成新的重组体的可能^[17]。检测以 AAV 为载体的重组基因药物对血液相关指标的影响,可以尽早发现未预料到的不良事件的危害。

以往研究表明安全性的检测成为了基因药物进入临床前必不可少的一部分^[21,22],血液系统至关重要^[23]。血液系统是贯穿全身的一个循环系统,机体的各个脏器的正常运行都是以血液循环为基础^[22]。因此,对于药物对血液系统的影响的研究尤为重要。本研究结果显示 rAAV-shRNA-CDK2 在靶向治疗肝癌的过程中,以 SPF 级 Balb/c 的血常规指标为参考^[9-11],无论是雄鼠还是雌鼠,除平均血小板体积略高于该周龄正常值范围外,其余指标数值均在正常值范围之内,且显示组间无差异,说明重组基因药物 rAAV-shRNA-CDK2 并未对血液常规数值产生影响。与此同时,我们也对给药后白细胞系各细胞比率进行了检测,发现雄裸鼠白细胞各细胞比率均在正常值范围内;雌裸鼠的中性粒细胞和淋巴细胞的百分比,在肿瘤组与

rAAV-shRNA-CDK2 比较时发现显著差异。其中, rAAV-shRNA-CDK2 组的淋巴细胞比率高于肿瘤组,提示 rAAV-shRNA-CDK2 对白细胞系比率产生了影响,但各数值均在正常参考值的范围内。

骨髓细胞是处于细胞周期运行中的增殖型细胞^[23]。骨髓细胞的细胞周期变化对机体各项功能有着巨大的影响。本实验通过调整肿瘤细胞的细胞周期来抑制肿瘤细胞的生长,因此骨髓细胞的周期测定必不可少。结果显示各组雄裸鼠各周期分布比较差异并无统计学意义,肿瘤组雌鼠 G2/M 期明显高于 rAAV-shRNA-CDK2 组,但其他数据却无显著性差异。本研究结果表明重组基因药物 rAAV-shRNA-CDK2 对骨髓细胞周期并无不良影响。

综上所述,重组基因药物 rAAV-shRNA-CDK2 治疗肝癌动物模型的过程中,对血常规、白细胞比率、骨髓细胞周期血液系统相关指标无明显不良影响,具有良好的安全性。

参考文献(References)

- [1] 蔡亚欣,樊沛澍,潘涛.肿瘤生物免疫靶向治疗技术研究新进展[J].医药,2017,3(3): 124
Cai Ya-xin, Fan Pei-shu, Pan Tao. Recent advances in tumor biological immune targeted therapy[J]. Medicine and pharmacy,2017, 3(3): 124
- [2] Murray AW, Marks D. Can sequencing shed light on cell cycling[J]. Nature, 2001, 409: 844-846
- [3] 于水澜,于英君,赵阳,等.树舌多糖 GF 对肝癌细胞的增殖抑制作用及对 CyclinE 基因 mRNA 表达的影响[J]. 中医药学报,2013,41(4): 52-54
Yu Shui-lan, Yu Ying-jun, Zhao Yang, et al. Effect of Ganoderma Appanatum Polysaccharides GF on Proliferative Inhibition of Liver Cancer Cells and the Expression of CyclinE mRNA [J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2013, 41(4): 52-54
- [4] 曹银芳,王文灏. SiRNA 沉默 CDK2 和 CyclinE 对人肺腺 A549 细胞周期的影响[J].内蒙古医学杂志,2017,49(01): 1-3
Cao Yin-fang, Wang Wen-hao. Effects of SiRNA to CDK2 and CyclinE on Cell Multiplication and Cycle of A549 Cell [J]. Inner Mongolia Med, 2017, 49(01): 1-3

- [5] 缪学建. CDK2 及 CyclinE 在脑膜瘤中的表达及意义[D]. 四川大学, 2015
Miao Xue-jian. The expression and significance of CDK2 and CyclinE in meningioma[D]. Sichuan Medical University, 2015
- [6] 张桂东, 尹清臣. CyclinE/CDK2 及 p27 在胃癌细胞周期 G₁/S 调控中的研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(3): 251-253
Zhang Gui-dong, Yin Qing-chen. Study on Cyclin E/CDK2 and p27 in the cell cycle G₁/S regulation of gastric cancer[J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2014, 16 (23): 251-253
- [7] 李娜, 曲芃芃. 滋养细胞疾病中 CyclinE 及其相关蛋白的表达[J]. 国际妇产科学杂志, 2014, 41(03): 324-326
Li Na, Qu Peng-peng. Expression of Cyclin E and Its Related Proteins in Gestational Trophoblastic Disease [J]. Journal of International Obstetrics and Gynecology, 2014, 41(03): 324-326
- [8] 于英君, 韩松洋, 姜颖, 等. 基于肝癌 CDK2 基因敲减对 CyclinE 表达及树舌多糖 GF 对其影响的研究 [J]. 现代生物医学进展, 2016, 23(16): 4434-4437+4461
Yu Ying-jun, Han Song-yang, Jiang Ying, et al. Study on the Effect of CDK2 Knockdown Decreases on the Expression of CyclinE and GAPS.GF in Hepatocellular Carcinoma [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(23): 4434-4437+4461
- [9] 刘科, 刘盛来, 杨林, 等. 不同性别 BALB/c 裸小鼠血液学及脏器系数观测[J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(1): 65-70
Liu Ke, Liu Sheng-lai, Yang Lin, et al. Observation of Hematology and organ coefficients in BALB/c nude mice of different sex [J]. Laboratory Animal and Comparative Medicine, 2014, 34 (1): 65-70
- [10] 尤金伟, 张立波, 方天. 绿色荧光裸鼠血液生理生化指标检测分析[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(9): 24-26
You Jin-wei, Zhang Li-bo, Fang Tian, et al. Measurement of the blood biochemical parameters in GFP transgenic nude mice [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2013, 23(9): 24-26
- [11] 张修颜, 詹纯列, 肖育华. SPF 级 Balb/c 小鼠脏器质量、脏器系数、血常规、血生化指标的测定与比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(41): 7734-7737
Zhang Xiu-yan, Zhan Chun-lie, Xiao Yu-hua, et al. Measurement and comparisons of organ coefficient, hematological parameters and hematological biochemical parameters of specific pathogen free Balb/c mice[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(41): 7734-7737
- [12] 邓洪新, 魏于全. 肿瘤基因治疗的研究现状和展望[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2015, 22(2): 170-176
Deng Hong-xin, Wei Yu-quan. Tumor gene therapy: Current status and future prospective [J]. Chin J Cancer Biother Apr, 2015, 22(2): 170-176
- [13] Jacobs F, Wang L. Adeno-associated viral vectors for correction of inborn errors of metabolism: progressing towards clinical application [J]. Curr Pharm Des, 2011, 17(24): 2500-2515
- [14] Mei Wang, Jun-jiang Sun, Ashley Crosby, et al. Direct Interaction of Human Serum Proteins with AAV Virions to Enhance AAV Transduction: Immediate Impact on Clinical Applications [J]. Gene Ther, 2017, 24(1): 49-59
- [15] Nguyen GN, George LA, Siner JI, et al. Novel factor VIII variants with a modified furin cleavage site improve the efficacy of gene therapy for hemophilia A[J]. Thromb Haemost, 2017, 15(1): 110-121
- [16] Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B [J]. The New England journal of medicine, 2014, 371(21): 1994-2004
- [17] Daniela Hüser, Dina Khalid, Timo Lutter, et al. High Prevalence of Infectious Adenoassociated Virus (AAV) in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells Indicative of T Lymphocytes as Sites of AAV Persistence[J]. Journal of Virology February, 2017, 91(4): e0213
- [18] Murphy SL, Li H, Zhou S, et al. Prolonged Susceptibility to Antibody-mediated Neutralization for Adeno-associated Vectors Targeted to the Liver[J]. Mol Ther, 2008, 16(1): 138-145
- [19] Arruda VR, Stedman HH, Haurigot, et al. Peripheral transvenular delivery of adeno-associated viral vectors to skeletal muscle as a novel therapy for hemophilia B[J]. Blood, 2010, 115(23): 4678-4688
- [20] Finn JD, Nichols TC, Svoronos N, et al. The efficacy and the risk of immunogenicity of FIX Padua (R338L) in hemophilia B dogs treated by AAV muscle gene therapy[J]. Blood, 2012, 120(23): 4521-4523
- [21] Kolosenko I, Edsbacker E, Björklund AC, et al. RNAi prodrugs targeting Plk1 induce specific gene silencing in primary cells from pediatric T-acute lymphoblastic leukemia patients [J]. Control Release, 2017, 261: 199-206
- [22] Geoffrey L. Rogers, Roland W. Herzog. Gene therapy for hemophilia [J]. Front Biosci, 2015, 20: 556-603
- [23] Q Ru, W Li, X Wang, et al. Preclinical study of rAAV2-sTRAIL: pharmaceutical efficacy, biodistribution and safety in animals [J]. Cancer Gene Therapy, 2017, 24: 251-258
- (上接第 753 页)
- Gu Fen, Hou Li-li, Li Yu-mei, et al. The depression status and its influencing factors of chemotherapy in patients with non-small cell lung cancer[J]. Chinese Journal of Prevention and Control of Chronic Diseases, 2016, 24(5): 359-362
- [27] Shimizu K, Nakaya N, Saito-Nakaya K, et al. Personality traits and coping styles explain anxiety in lung cancer patients to a greater extent than other factors[J]. Jpn J Clin Oncol, 2015, 45(5): 456-463
- [28] Hendriksen E, Williams E, Sporn N, et al. Worried together: a qualitative study of shared anxiety in patients with metastatic non-small cell lung cancer and their family caregivers[J]. Support Care Cancer, 2015, 23(4): 1035-1041
- [29] 张金梅, 颜美琼, 刘晓芯, 等. 肺癌化疗患者心理体验的质性研究[J]. 国际护理学杂志, 2014, 33(11): 3185-3187
Zhang Jin-mei, Yan Mei-qiong, Liu Xiao-xin, et al. Qualitative research on psychological experience of lung cancer patients during chemotherapy [J]. International Journal of Nursing, 2014, 33 (11): 3185-3187
- [30] Park SA, Chung SH, Lee Y. Factors Associated with Suicide Risk in Advanced Cancer Patients: A Cross-Sectional Study [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(11): 4831-4836